

## ANÁLISE METABOLÔMICA DO SORO DE CÃES ADULTOS SAUDÁVEIS APÓS INGESTÃO DE NÍVEIS CRESCENTES DE BETA-GLUCANOS DE LEVEDURA

PEDRO H. MARCHI<sup>1</sup>; LEONARDO A. PRÍNCIPE<sup>1</sup>; CINTHIA G. L. CESAR<sup>1</sup>; ADRIELLY A. DO CARMO<sup>1</sup>; GABRIELA L. F. FINARDI<sup>1</sup>; FELIPE S. TRINDADE<sup>1</sup>; LUIZ A. COLNAGO<sup>2</sup>; JÚLIO C. C. BALIEIRO<sup>1</sup>; THIAGO H. A. VENDRAMINI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos (CEPEN Pet) – FMVZ/USP – Pirassununga, SP; <sup>2</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – São Carlos, SP.

Contato: pedro.henrique.marchi@usp.br / Apresentador: PEDRO H. MARCHI

**Resumo:** A ingestão de beta-1,3/1,6-glucanos purificados de levedura resulta em benefícios imunológicos, intestinais e metabólicos em cães. No entanto, a influência deste nutracêutico em vias metabólicas caninas nunca foi elucidada. Portanto, este estudo avaliou os efeitos da inclusão de beta-1,3/1,6-glucanos purificados de *Saccharomyces cerevisiae* em alimento extrusado seco sobre o perfil metabólico de cães. Oito cães adultos saudáveis foram selecionados e divididos em dois quadrados latinos 4x4 balanceados. Em cada período, amostras de soro foram obtidas após 35 dias de adaptação às dietas. Os espectros metabólicos foram obtidos por ressonância magnética nuclear. Análises estatísticas multivariadas foram realizadas no software MetaboAnalyst<sup>®</sup> e análises de variância foram realizadas no programa *Statistical Analysis System*. Ao todo, foram identificados 12 metabólitos principais. A análise de principais componentes destes compostos revelou sobreposições entre os tratamentos. No entanto, a análise hierárquica de mapa de calor revelou diferença na intensidade desses metabólitos e possibilitou a identificação das vias metabólicas mais relevantes para a diferenciação dos grupos. Foi possível concluir que os beta-glucanos estimulam certas vias metabólicas proteicas, energéticas e lipídicas.

**Palavras-Chaves:** bioquímica, caninos, ciências ômicas, metabolismo, suplementação.

## HEALTHY ADULT DOGS' SERUM METABOLOMIC ANALYSIS AFTER INTAKE OF INCREASING LEVELS OF YEAST BETA-GLUCAN

**Abstract:** Purified yeast beta-1,3/1,6-glucans intake results in immunological, intestinal, and metabolic benefits in dogs. However, the influence of this nutraceutical on canine metabolic pathways is not fully understood. Therefore, this study evaluated the effects of *Saccharomyces cerevisiae* purified beta-1,3/1,6-glucans in dry extruded food on the dogs' metabolomic profile. Eight healthy adult dogs were selected and divided into two balanced 4x4 Latin squares. In each period, serum samples were obtained after 35 days of diet acclimation. Metabolic spectra were obtained by nuclear magnetic resonance. Multivariate statistical analyses were performed using the MetaboAnalyst<sup>®</sup> software, and analyses of variance were conducted using the Statistical Analysis System program. Altogether, 12 major metabolites were identified. Principal component analysis of these compounds revealed overlaps between treatments. However, hierarchical clustering analysis heatmap revealed differences in the intensity of these metabolites and enabled the identification of the most relevant metabolic pathways for group differentiation. It was possible to conclude that beta-glucans stimulate certain protein, energy, and lipid metabolic pathways.

**Keywords:** biochemistry, canines, metabolism, omics sciences, supplementation.

**Introdução:** Os beta-1,3/1,6-glucanos obtidos da parede celular de leveduras têm sido amplamente utilizados na alimentação animal. São demonstrados benefícios em várias espécies, dentre as quais mamíferos, peixes e certos invertebrados. Em cães, a suplementação com beta-1,3/1,6-glucanos purificados de *Saccharomyces cerevisiae* demonstrou-se benéfica sobre o sistema imunológico (de Oliveira et al., 2019), metabolismo de glicose e lipídios (Ferreira et al., 2022) e modulação de microrganismos importantes presentes no microbioma intestinal canino (Marchi et al., 2024). No entanto, os mecanismos de ação e a maneira como este nutracêutico interage com as vias metabólicas caninas nunca foi completamente elucidada. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da adição de 0,0, 0,07, 0,14 e 0,28% de beta-1,3/1,6-glucanos purificados de *Saccharomyces cerevisiae* em alimento seco extrusado sobre a metabolômica sérica de cães adultos saudáveis.

**Material e Métodos:** O estudo foi conduzido de acordo com os preceitos da Comissão de Ética no Uso de Animais, sob protocolo número 2866090223. Quatro cães border collie e quatro cocker spaniel inglês, machos e fêmeas, com idade de 3,5±0,5 anos e escore de condição corporal ideal (Laflamme, 1997) foram distribuídos aleatoriamente em dois quadrados latinos 4x4 balanceados. Foram extrusados quatro alimentos experimentais isonutritivos, com inclusão de teores crescentes de beta-glucanos (0,0%; 0,07%; 0,14%; 0,28%). A necessidade energética de manutenção dos cães foi determinada por meio da equação: 95kcal/peso corporal<sup>0,75</sup> (FEDIAF, 2021). Cada período consistiu de 35 dias: 34 dias para adaptação às dietas e um dia para colheita de sangue e obtenção de soro. A aquisição dos espectros metabólicos foi realizada por ressonância magnética nuclear. Os metabólitos foram atribuídos com base nos deslocamentos químicos e multiplicidades de sinal, no software Chenomx (Beckonert et al., 2007). Os dados do metaboloma foram carregados e analisados no Metaboanalyst 5.0 (Chong et al., 2019). A análise de componentes principais (PCA) foi realizada para identificar os principais metabólitos, que foram agrupados hierarquicamente em mapa de calor para comparação de intensidade entre os tratamentos. Em seguida, análise de enriquecimento foi empregada para mapear as vias metabólicas mais relevantes. Por fim, foi realizada análise de variância para comparar as abundâncias médias dos metabólitos entre os grupos, por meio do procedimento MIXED do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.4.

**Resultado e Discussão:** A PCA e gráfico de *loadings* obtidos por meio da avaliação do conjunto completo de dados (Figura

1) revelou 15 diferentes lipídios associados com o componente principal 1 (PC1) e 12 metabólitos principais associados o componente principal 2 (PC2). Com base nestes 12 compostos identificados, foi realizada uma segunda PCA, que revelou regiões de sobreposição entre os tratamentos (Figura 2). Ademais, a análise de variância não demonstrou diferença na abundância dos metabólitos entre os grupos (Tabela 1). Neste sentido, os resultados combinados observados tanto em comparações uni- quanto multivariadas demonstram baixa disparidade entre o perfil metabólico dos animais (Carlos et al., 2020). No entanto, a análise hierárquica de mapa de calor demonstrou diferença na intensidade dos 12 metabólitos entre os tratamentos (Figura 3). Observa-se que o grupo controle demonstrou disparidade e intensidade negativa para a maioria dos compostos. Ademais, o colesterol e a L-acetilcarnitina foram fortemente associadas com diferenças no perfil metabólico dos cães do grupo 0,14%; estes compostos são cruciais para o metabolismo lipídico e a beta-oxidação de ácidos graxos (Nelson; Cox, 2019). Com base nas diferenças de intensidade dos metabólitos, análise de enriquecimento determinou as rotas metabólicas mais relevantes (Figura 4). As principais vias são marcadas por nós mais escuros (maior valor de P) e de maior tamanho (análise de maior impacto), e estão correlacionadas com o metabolismo proteico e energético, principalmente.

Tabela 1. Abundância dos principais metabólitos séricos identificados.

Metabólitos (ppm)	Tratamentos				EPM	p
	0,0%	0,07%	0,14%	0,28%		
Alanina	747,24	763,63	786,18	796,79	38,95	0,7682
Citrato	160,19	165,34	158,03	164,84	7,96	0,8817
Creatina	113,54	116,37	113,66	116,05	5,06	0,9604
Colesterol	392,09	395,36	455,38	443,84	39,93	0,3563
Fenilalanina	85,00	84,39	77,32	83,80	8,85	0,7469
Glicose	123,60	135,83	119,84	149,10	20,44	0,7395
Glutamina	959,73	992,25	1001,40	1056,11	59,79	0,6708
Histidina	46,00	44,24	36,05	41,39	4,53	0,3875
Lactato	1113,70	1119,77	1134,20	1161,36	68,08	0,9421
L-acetilcarnitina	1157,84	1205,81	1271,75	1255,38	67,57	0,6065
N-acetil-glicoproteínas	1049,78	1077,30	1111,22	1141,66	58,40	0,6546
Valina	921,29	942,20	985,75	988,88	55,07	0,7034

Legenda: EPM = erro padrão da média.

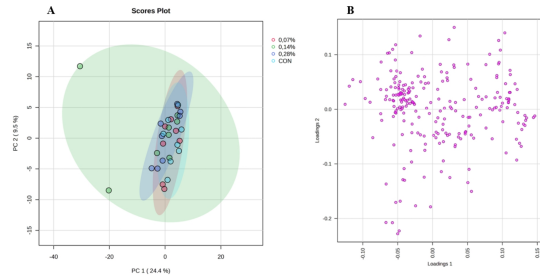


Figura 1. (A) Gráfico de análise de componentes principais que considerou todo o conjunto de dados dos espectros obtidos. (B) Loadings da distribuição dos metabólitos no gráfico.

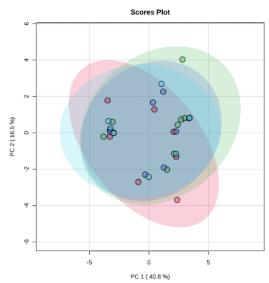


Figura 2. Gráfico de análise de componentes principais dos principais metabólitos

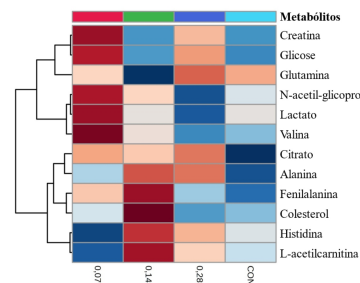


Figura 3. Gráfico de análise hierárquica de mapa de calor dos principais metabólitos identificados.

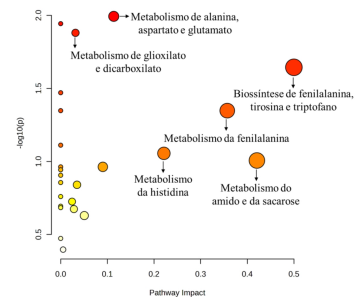


Figura 4. Análise de vias dos principais metabólitos identificados.

**Conclusão:** As doses crescentes de inclusão de beta-1,3/1,6-glucanos purificados neste estudo modularam vias do metabolismo de proteínas e energia. Além disso, foram encontradas diferenças específicas relacionadas ao metabolismo do colesterol e dos ácidos graxos, o que sugere potencial para novas explorações por meio da lipidômica.

**Agradecimentos:** Os autores agradecem a Grandfood Indústria e Comércio LTDA. (PremieRpet®) e a Biorigin® pelo apoio ao estudo e produção de dietas.

**Referências Bibliográficas:** BECKONERT, O. et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols*, v. 2, p. 2692–2703, 2007. CARLOS, G. et al. Canine metabolomics advances. *Metabolomics: Official Journal of the Metabolomic Society*, v. 16, p. 16, 2020. CHONG, J. et al. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*, v. 68, p. e86, 2019. DE OLIVEIRA, C. A. F. et al.  $\beta$ -Glucan successfully stimulated the immune system in different jawed vertebrate species. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 62, p. 1–6, 2019. FEDIAF. The European Pet Food Industry Federation. Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs. Bruxelas, BE: The European Pet Food Industry Federation, 2021. FERREIRA, C. S. et al. Metabolic variables of obese dogs with insulin resistance supplemented with yeast beta-glucan. *BMC Veterinary Research*, v. 18, p. 14, 2022. LAFLAMME, D. Development and Validation of a Body Condition Score System for Dogs. *Canine Practice*, v. 22, p. 10–15, 1997. MARCHI, P. H. et al. Effects of Increasing Levels of Purified Beta-1,3/1,6-Glucans on the Fecal Microbiome, Digestibility, and Immunity Variables of Healthy Adult Dogs. *Microorganisms*, v. 12, p. 113, 2024. NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 7ª edição. Porto Alegre: Artmed Editora, 2019.